

dapat mempercepat proses pengeringan. Kemudian daun, rimpang dan bunga yang telah dirajang dikeringkan menggunakan oven pada suhu kurang lebih 40° C. Pengeringan dilakukan menggunakan oven karena suhu dapat diatur secara konstan dan pemanasan yang rata, sehingga simplisia dapat kering secara merata. Selanjutnya dilakukan sortasi kering untuk memisahkan simplisia dari pengotor. Kemudian simplisia disimpan pada wadah.

V.2. Pembuatan Ekstrak

Ekstrak daun, rimpang, dan bunga kecombrang di ekstraksi dengan cara maserasi (metode cara dingin) dengan masing – masing direndam dengan etanol 70% dalam wadah tertutup dan dibiarkan selama 1 x 24 jam diulangi sebanyak 3x dan terlindung dari cahaya, sambil diaduk. Ampas diperas menggunakan kain batis, kemudian endapan dipisahkan. Hasil maserasi di saring, sehingga diperoleh ekstrak cair daun, rimpang, dan bunga kecombrang (*Etlintera elatior*).

Ekstrak yang diperoleh kemudian di pekatkan dengan alat *rotary vaporator* pada suhu 40°C dengan tekanan 175 mbar sampai diperoleh ekstrak kental. Proses ekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% yang merupakan pelarut universal, sehingga diharapkan hampir semua senyawa yang terkandung dalam daun, rimpang, dan bunga kecombrang dapat tersari dengan menggunakan pelarut ini.

Pada proses pemekatan ekstrak, digunakan suhu terendah yaitu 40°C untuk menguapkan pelarutnya, karena dengan menggunakan alat *vaporator*, maka proses penguapan telah dibantu dengan tekanan rendah, sehingga tidak diperlukan suhu untuk menguapkan

pelarutnya. Dari proses penguapan pelarut diperoleh rendemen ekstrak pada Tabel VI.1 sebagai berikut:

Tabel VI.1. Rendemen Ekstrak Daun, Rimpang, dan Bunga
Kecombrang (*Etlingera elatior*)

	E. Daun	E. Rimpang	E. Bunga
Berat Simplisia (g)	2000	1050	584
Berat Ekstrak (g)	221,75	57,17	53,30
Rendemen (%)	11,08	11,43	10,66

V.3. Karakteristik Ekstrak

Proses karakterisasi ekstrak meliputi pengujian penetapan susut pengeringan, kadar abu total, dan bobot jenis. Karakteristik ekstrak merupakan salah satu parameter standarisasi ekstrak. Karakteristik ekstrak bertujuan untuk mengetahui mutu dan kualitas ekstrak yang digunakan yang akan mempengaruhi suatu pengujian. Diperoleh hasil karakteristik ekstrak pada Tabel VI.2. sebagai berikut:

Tabel VI.2. Hasil Karakteristik Ekstrak

	E. Daun	E. Rimpang	E. Bunga
Susut Pengeringan (% b/b)	10,65	11,14	11,15
Kadar Abu Total (% b/b)	10,32	8,18	13,04
Bobot Jenis (g/ml)	0,81	0,94	0,92

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal mengenai besarnya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan (Depkes RI, 2000:13).

Penentuan kadar abu total dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai diperoleh ekstrak baik yang berasal dari tanaman secara alami maupun kontaminan selama proses. Prinsip penentuan kadar abu ini yaitu sejumlah bahan dipanaskan pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sehingga tinggal unsur mineral dan anorganik yang tersisa. (Depkes RI, 2000:17).

Penentuan bobot jenis adalah perbandingan bobot zat di udara pada suhu 25°C terhadap bobot air dengan volume dan suhu yang sama. Tujuan dari penentuan bobot jenis ini yaitu memberi batas besarnya masa per satuan volume. Penetapan bobot jenis akan memberikan gambaran kandungan kimia terlarut dalam ekstrak. Semakin besar bobot jenis, semakin tinggi kandungan kimia terlarut dalam ekstrak (Depkes RI, 2000:14).

VI. 4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui keberadaan golongan – golongan senyawa dalam tanaman, hal ini dilakukan sebagai informasi awal dalam mengetahui senyawa kimia apa saja yang terdapat dalam suatu tanaman. Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi pengujian alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon,

steroid/triterpenoid. Dari hasil pengujian skrining fitokimia pada ekstrak daun, rimpang, dan bunga kecombrang dapat dilihat pada Tabel VI.3 sebagai berikut:

Tabel VI.3. Hasil Skrining Fitokimia

Pemeriksaan	E. Daun	E. Rimpang	E. Bunga
Alkaloid	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	-	-
Tanin	+	+	+
Kuinon	+	+	+
Steroid/Triterpenoid	+	+	+

Ket : + = mengandung senyawa yang diuji

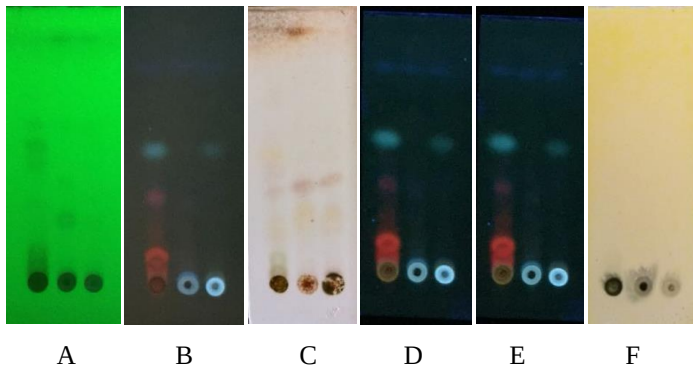
- = tidak mengandung senyawa yang diuji

VI.5. Pemantauan Ekstrak

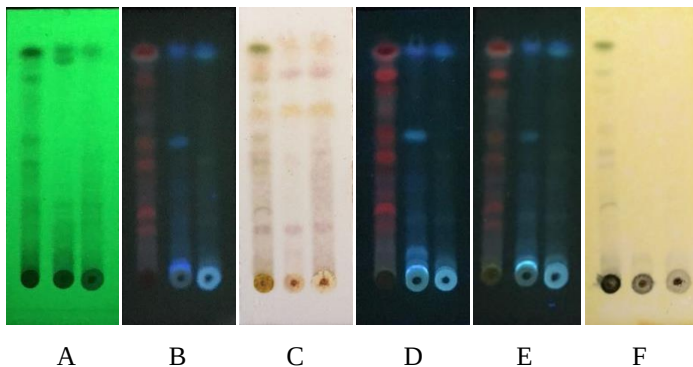
Pemantauan ekstrak dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dalam ekstrak secara kualitatif. Menggunakan metode kromatografi lapis tipis, fase diam yang digunakan adalah silika gel F₂₅₄ dan fase geraknya menggunakan tiga eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda untuk melihat spot yang terbentuk pada masing-masing tingkat kepolaran.

Fase gerak non polar menggunakan perbandingan pelarut n-heksan : etil asetat (8:2), fase gerak semi polar menggunakan kloroform : metanol (9:1), fase gerak polar menggunakan butanol : asam asetat : air (4:1:5). Pengamatan dilakukan dibawah lampu UV 254 nm dan

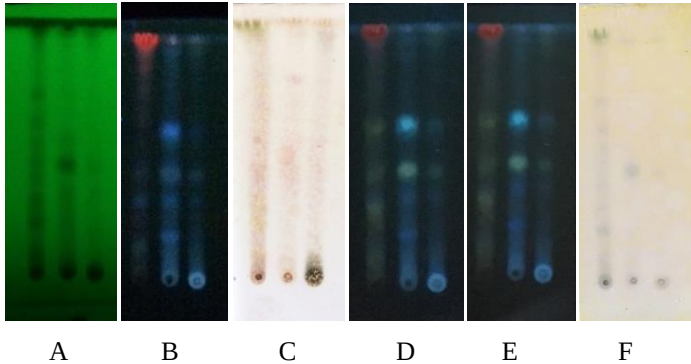
365 nm, menggunakan penampak bercak AlCl_3 5%, H_2SO_4 , FeCl_3 10%, Sitroborat. Adapun hasil pemantauan nya sebagai berikut:



Gambar VI.1 : Profil Kromatografi Ekstrak Daun (1), Bunga (2), dan Rimpang Kecombrang (3) dengan fase gerak non polar n-Heksan : Etil asetat (8 : 2).



Gambar VI.2 : Profil Kromatografi Ekstrak Daun (1), Bunga (2), dan Rimpang Kecombrang (3) dengan fase gerak semipolar kloroform: metanol (9:1).



Gambar VI.3 : Profil Kromatografi Ekstrak Daun (1), Bunga (2), dan Rimpang Kecombrang (3) dengan fase gerak polar Etil asetat: as.format: Air (8:1:1).

Keterangan : Ekstrak daun kecombrang (1), ekstrak bunga kecombrang (2), ekstrak rimpang kecombrang (3). (A) Sinar UV 254nm, (B) Sinar UV 365nm, (C) Penampak bercak H_2SO_4 , (D) Penampak bercak Sitroborat, (E) Penampak bercak $AlCl_3$, (F) Penampak bercak $FeCl_3$.

Pemantauan ekstrak menggunakan kromatografi lapis tipis menunjukkan adanya bercak kuning setelah disemprot dengan pereaksi $AlCl_3$ dan sitroborat menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada ekstrak daun, bunga, dan rimpang daun kecombrang. Bercak paling jelas terdapat pada fase gerak polar etil asetat-asam format-air (8:1:1). Penyemprotan dengan pereaksi semprot $FeCl_3$ menunjukkan adanya bercak hitam (ditunjukkan lingkaran hitam), menunjukkan adanya senyawa fenol.

VI.6. Pengujian Aktivitas Sitotoksik dan Antiproliferasi terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7 dengan Metode MTT-Assay

- **Uji Sitotoksik Sel Kanker Payudara MCF-7**

Pengujian terhadap sel kanker payudara dimaksudkan untuk mengetahui aktivitas sitotoksik ekstrak daun, rimpang dan bunga kecombrang. Uji sitotoksik terhadap kultur sel kanker payudara MCF-7 dilakukan dengan metode MTT Assay.

Tahap pertama dilakukan terlebih dahulu pembuatan media kultur RPMI 1640. Media kultur dilakukan untuk tempat penumbuhan sel yang akan digunakan. Media Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 banyak digunakan untuk kultur sel dan kultur jaringan, secara tradisional digunakan untuk kultur sel-sel limfoid. Media Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640) merupakan media yang banyak digunakan untuk kultur vertebrata, media RPMI 1640 memiliki variasi jumlah asam amino. Glukosa merupakan salah satu faktor penentu dalam pertumbuhan sel dan termasuk bahan yang mudah habis, sehingga untuk mempertahankan kehidupan dan produktivitas kultur sel perlu ada tambahan bahan nutrisi dengan penggantian media lama dengan media baru baru secara keseluruhan atau hanya sebagian setiap hari atau 2-3 hari sekali (Malole, 1990).

Selanjutnya dilakukan *Thawing* atau penumbuhan sel. Proses menumbuhkan sel (Cell Thawing) bertujuan untuk mengatur pertumbuhan sel dari tangki nitrogen cair yang telah lama disimpan.

Sel kanker yang tidak digunakan dalam jangka waktu yang panjang, biasanya disimpan pada tangki nitrogen cair dengan tekanan atmosfer normal bersuhu -152°C hingga -200°C . Namun, apabila sel kanker yang akan disimpan untuk penggunaan 2-3 tahun, penyimpanan sel bisa dilakukan pada suhu -80°C . Kemudian, sel yang disimpan tersebut bisa ditumbuhkan kembali dalam medium apabila akan digunakan untuk pengujian *in vitro* (CCRC, 2009).

Pada proses penumbuhan sel, perlu diperhatikan beberapa faktor agar sel dapat tumbuh dengan baik pada mediumnya, sehingga hasil analisis yang diperoleh menjadi valid. Sel kanker yang digunakan pada penelitian ini adalah sel line kanker MCF-7 yang berasal dari Laboratorium Sitogenetika UNPAD, Bandung dan memakai sel line kanker MCF-7 milik Ahmad Faried, dr., Sp. BS, PhD. Sel kanker diambil dari cryotube yang telah disimpan di dalam tangki nitrogen cair pada suhu -80°C . Sel kemudian segera dicairkan pada suhu 37°C dan segera dipindahkan pada conical tube yang berisi media kultur (CCRC, 2009).

Pada tahap subkultur sel tujuan dilakukannya subkultur yakni untuk mempertahankan kecepatan pertumbuhan sel. Subkultur merupakan proses pemindahan sel dari kondisi konfluen ke tempat tumbuh yang masih kosong. Sel dikatakan konfluen apabila kepadatan pertumbuhan sel sudah mencapai 70-80%. Pada pelaksanaannya, sel yang akan disubkultur dibilas dengan PBS (Phosfar Buffer Saline) pada flask T25. Penggunaan PBS sebagai buffer bertujuan untuk membantu mempertahankan pH sel agar tetap konstan. Hal ini karena pada sebagian sel diperlukan pH khusus untuk tumbuh dan

pH yang digunakan tersebut biasanya berada pada rentang 7-8. Setelah pelakuan pembilasan ini, kemudian dilakukan penambahan larutan tripsin-EDTA untuk melepaskan sel yang telah menempel pada bagian dasar flask. Setelah penambahan tripsin-EDTA, kemudian dilakukan inkubasi selama 3 menit dan tidak boleh lebih. Hal ini karena tripsin-EDTA dapat menyebabkan kematian sel apabila terlalu lama diinkubasi dengan sel, dan penambahan media komplit pada larutan sampel dapat digunakan untuk menghentikan efek kematian sel yang disebabkan tripsin-EDTA tersebut. Proses selanjutnya pada subkultur ini adalah sentrifuga. Proses sentrifuga dilakukan untuk memurnikan sel yang diinginkan. Prinsip pemisahan sentrifuga yakni objek diputar secara horizontal pada jarak tertentu. Apabila objek berotasi di dalam tabung atau silinder yang berisi campuran cairan dan partikel, maka campuran tersebut dapat bergerak menuju pusat rotasi. Hasil dari sentrifuga ini berupa sel pellet dan filtrat. Filtrat yang dihasilkan dibuang, kemudian diganti dengan 6 ml media komplit baru (CCRC, 2009).

Selanjutnya untuk mengetahui kepadatan sel dilakukan perhitungan sel untuk uji sitotoksik pada penelitian ini menggunakan hemositometer di bawah mikroskop cahaya. Syarat perhitungan sel dengan metode hemositormeter yakni sel harus tunggal dan tidak boleh bergerombol. Sebelum proses perhitungan di bawah mikroskop cahaya dilakukan, ditambahkan terlebih dahulu 10 μ L *tryphan blue dye* pada hemositometer. Penggunaan *tryphan blue dye* ini bertujuan untuk memberikan warna pada sel mati sehingga memudahkan perhitungan sel saat dilihat di bawah mikroskop.

Larutan *tryphan blue dye* akan diserap oleh sel mati karena integritas membrannya sudah rusak, sedangkan sel hidup dengan membran sel yang masih baik tidak akan terwarnai. Jumlah sel yang dibutuhkan untuk melakukan uji sitotoksik ini sebanyak 20.000 sel untuk setiap sumurannya. Pada penelitian ini, well plate yang digunakan berjumlah 186 sumuran, sehingga sel yang dibutuhkan sebanyak $186/4 \times 2 \times 10^4$ sel. Kemudian, jumlah sel yang terhitung pada hemositometer yakni $50,5 \times 10^4$ sel/ml. Maka, jumlah sel yang diambil pada media kultur untuk penelitian ini sebanyak 7360 μL dan ditambahkan media kultur RPMI sebanyak 30640 μL . (CCRC, 2009).

Pada preparasi sampel, ekstrak daun, rimpang, dan bunga kecombrang (*Etlingera elatior*) dilarutkan dalam DMSO (Dimetil Sulfoksida). Pengenceran larutan induk sampel dalam DMSO dilakukan menggunakan Medium (CCRC, 2008). Konsentrasi ekstrak daun, rimpang, dan bunga adalah 200 $\mu\text{g/mL}$; 150 $\mu\text{g/mL}$; 100 $\mu\text{g/mL}$ dan 50 $\mu\text{g/mL}$. Pemilihan DMSO sebagai pelarut sampel uji karena merupakan pelarut yang dapat berpenetrasi secara baik ke dalam sel (Freshney, 2010).

Selanjutnya melakukan tahap MTT untuk mengetahui sitotoksitasnya terlebih dahulu. Metode MTT merupakan metode kolorimetrik, dimana pereaksi MTT ini merupakan garam tetrazolium yang dapat membentuk kristal formazan oleh sistem suksinat dehidrogenase yang terdapat pada mitokondria sel hidup (Loo & Rillema, 1998). Kristal formazan yang terbentuk

memberikan warna ungu sehingga dapat dibaca absorbansinya dengan menggunakan *ELISA reader*. Semakin banyak kristal formazan yang terbentuk mengindikasikan bahwa semakin banyak pula sel kanker yang hidup karena sel yang mati atau rusak tidak memiliki kemampuan untuk mereduksi garam tetrazolium.

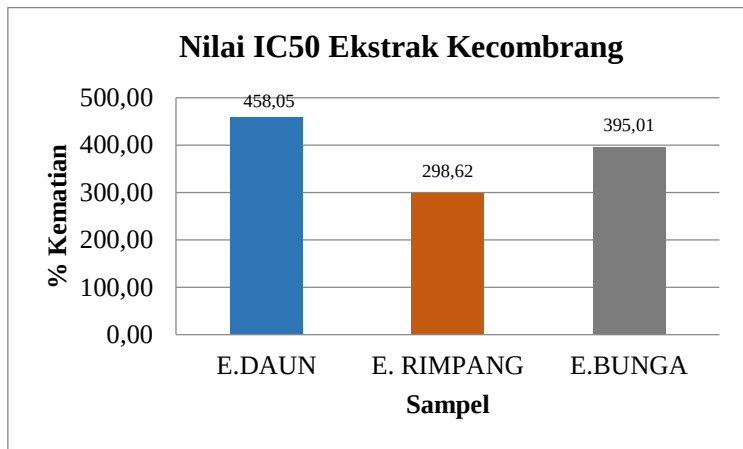
Uji ini merupakan uji pendahuluan untuk mengetahui potensi ketoksikan senyawa terhadap sel kanker dan dapat digunakan sebagai acuan untuk menentukan kadar pada uji selanjutnya yaitu uji antiproliferatif. Uji sitotoksitas merupakan kelanjutan setelah senyawa tertentu diketahui bersifat toksik. Senyawa toksik dengan kemungkinan sitotoksik belum tentu bersifat antitumor, meskipun senyawa antitumor bersifat toksik dan juga selalu toksik pada dosis tinggi (Mulyani, 1995).

Parameter pengamatan untuk menunjukkan adanya aktivitas antiproliferasi ekstrak daun, rimpang dan bunga kecombrang dinyatakan dalam IC_{50} (Doyle & Graffiths, 2000). Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi yang dapat menyebabkan penghambatan proliferasi 50% dari populasi sel yang sama dalam waktu yang spesifik dan kondisi percobaan yang sesuai. Nilai IC_{50} merupakan nilai yang menunjukkan sifat sitotoksik bahan uji yang di peroleh dengan menggunakan analisa regresi linear antara log konsentrasi dengan nilai probit persen kematian.

Kemudian ditambahkan DMSO sebagai larutan stoper yang dapat melarutkan kristal formazan. Setelah itu, sampel diukur

absorbansinya menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 550 nm. (CCRC, 2009).

Untuk hasil nilai IC_{50} pada waktu 24 jam dari penelitian ini sebagai berikut :



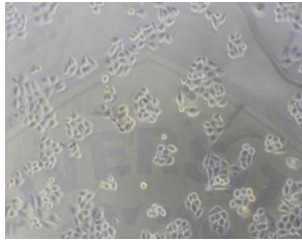
Gambar VI.4. Nilai IC_{50} Ekstrak Kecombrang Terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7

Dari hasil grafik diatas menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak daun sebesar 458,05 $\mu g/ml$, ekstrak rimpang sebesar 298,62 $\mu g/ml$ dan ekstrak bunga sebesar 395,01 $\mu g/ml$ dari ketiga hasil diatas nilai IC_{50} yang baik adalah rimpang karena nilai IC_{50} yang didapatkan sebesar 298,62 $\mu g/ml$ lebih kecil diantara ekstrak daun dan bunga, dan hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak rimpang dapat menghambat 50% aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker payudara.

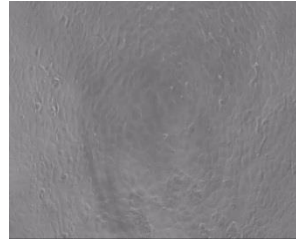
- **Uji Antiproliferasi (*doubling time*) terhadap Sel Kanker Payudara MCF-7**

Uji proliferasi dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun, rimpang dan bunga kecombrang dalam menghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7. *Doubling time* merupakan waktu yang diperlukan oleh sel untuk menggandakan dirinya menjadi dua kali lipatnya (Nurani LH, 2011). Sifat sitotoksik dapat dikaitkan dengan kemampuan senyawa untuk memacu terjadinya *cell cycle arrest* atau memacu apoptosis sel kanker, untuk itu perlu dilakukan pengamatan lebih lanjut dengan uji *doubling time* dan pengecatan DNA.

Pada uji antiproliferasi ini dilakukan dengan menggunakan seri kadar yaitu 50 µg/ml yang ditentukan dari IC₅₀ pada uji sitotoksitas, dimana kadar tersebut memiliki persentase kematian sel masih sedikit. Pemilihan kadar dari larutan uji yang digunakan masih sedikit yang diperoleh pada uji sitotoksitas agar sel dapat diamati pertumbuhan serta morfologinya karena sel tidak terlalu banyak yang mati. Morfologi sel MCF-7 pada kontrol dan perlakuan senyawa uji pada kadar 50 µg/ml dapat dilihat pada Gambar VI.5. Sel yang hidup pada kontrol terlihat tampak cerah (cemerlang), bentuknya bulat, bergerombol dan menempel di dasar sumuran sedangkan pada perlakuan terlihat adanya sel yang mati karena bentuknya sudah berubah dimana bentuknya sudah tidak bulat lagi dan tampak gelap.



Kontrol Sel (a)



E.D 50 µg/ml (b)



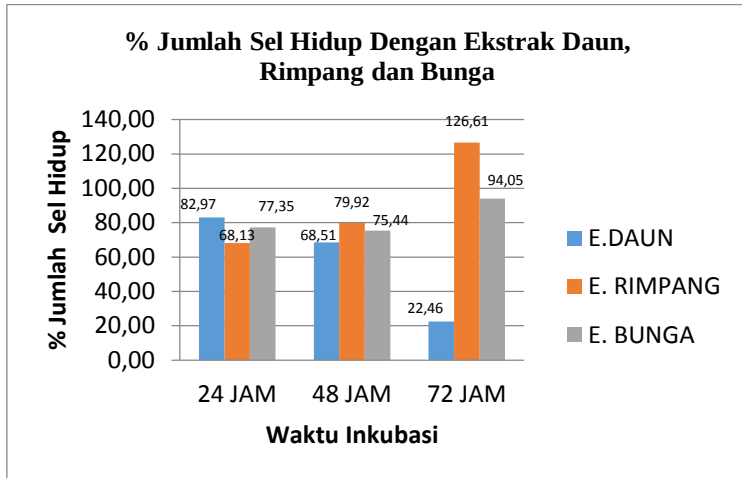
E. R 50 µg/ml (c)



E. B 50 µg/ml (d)

Gambar VI.5 : Morfologi sel kanker payudara MCF-7. Kontrol sel (a), Ekstrak daun 50 µg/ml (b), Ekstrak rimpang 50 µg/ml (c), Ekstrak bunga 50 µg/ml (d)

Sebelum melakukan perhitungan *doubling time* dibuat grafik % jumlah sel hidup terlebih dahulu untuk mengetahui pengaruh waktu yang terjadi kepada sel tersebut. Untuk hasil dari % jumlah sel hidup sel kanker payudara MCF-7 adalah sebagai berikut:



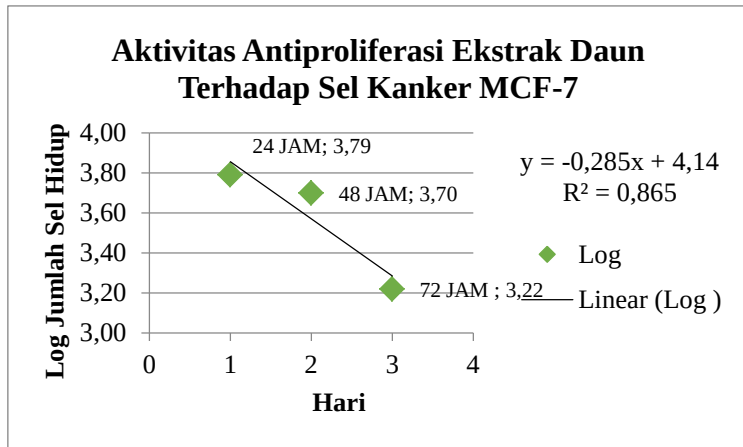
Gambar VI.6. % Jumlah Sel Hidup dengan Ekstrak Daun, Rimpang, Bunga Setelah 24, 48, 72 jam

Pada data diatas menunjukkan bahwa % jumlah sel hidup yang baik dan grafiknya menunjukkan bahwa ekstrak daun yang semakin lama waktu semakin menurun % jumlah sel hidupnya. Tandanya bahwa semakin lama waktu inkubasi dan sampel yang digunakan memberikan efek penghambatan pada sel tersebut. Dan % jumlah sel hidup ini berguna untuk perhitungan selanjutnya yaitu untuk mengetahui berapa lama *doubling time* yang dicapai.

Setelah % jumlah sel hidup diketahui pada jam 24, 48, dan 72 kemudian ditentukan kemampuan penghambatan proliferasi sel. Efek antiproliferatif terhadap sel kanker payudara MCF-7 dapat dianalisis dengan cara membandingkan waktu yang diperlukan sel pada masing-masing perlakuan untuk menggandakan dirinya menjadi dua

kali lipat. Perhitungan *doubling time* dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi antara waktu inkubasi dan log jumlah sel hidup, kemudian dari persamaan tersebut dimasukkan nilai log jumlah dua kali sel awal sebagai nilai y , maka akan diperoleh nilai x sebagai *doubling time* nya.

Adapun grafik antara log jumlah sel hidup terhadap waktu ditunjukkan pada gambar:



Gambar VI.7. Aktivitas Antiproliferasi Ekstrak Daun terhadap Sel MCF-7

Ket : Jumlah Sel Hidup = $\frac{\% \text{ jumlah sel hidup}}{100} \times \text{jumlah sel awal}$

Pada uji antiproliferasi ini dilakukan perhitungan untuk mengetahui waktu yang diperlukan sel untuk membelah menjadi dua kali lipatnya. Penghitungan *doubling time* yang merupakan parameter dari uji antiproliferasi dilakukan dengan menggunakan persamaan

regresi linear yang diperoleh dengan cara memplotkan waktu inkubasi versus log jumlah sel hidup kemudian hasilnya dimasukkan ke dalam rumus:

$$\frac{Y - A}{B}$$

Tabel VI.4. Hasil pengamatan regresi linear dan harga *doubling time* sel kanker payudara MCF-7

Perlakuan	Persamaan	Doubling Time (jam)
E. Daun	$y = -0,285x + 4,14$	51,66

Pada Tabel VI.4. dapat dilihat bahwa harga *doubling time* pada ekstrak daun 51,66 jam sedangkan ekstrak rimpang dan ekstrak bunga tidak bisa dihitung dikarenakan % jumlah sel hidupnya tidak menurun tandanya tidak ada potensi dari ekstrak rimpang dan bunga sebagai antiproliferasi. Berarti pada perlakuan dengan menggunakan ekstrak daun dapat memperpanjang *doubling time* sel kanker payudara MCF-7. Dari hasil penelitian tersebut dapat menunjukkan adanya potensi antiproliferasi dari ekstrak daun kecombrang dengan menunda *doubling time* atau menghambat proliferasi dimana besarnya penundaan tergantung kadar ekstrak yang diberikan. Semakin tinggi kadar ekstrak, semakin tinggi pula terjadinya hambatan pada pertumbuhan sel kanker payudara MCF-7, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kecombrang mempunyai potensi antiproliferasi melalui mekanisme penundaan waktu penggandaan. Fenomena penundaan proliferasi dan kematian sel

kanker payudara MCF-7 kemungkinan dapat disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu adanya kandungan senyawa di dalam ekstrak tersebut yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker payudara. (Muhilal, 1991).